



REC'D 21 NOV 2000

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 47 354.4

Anmeldetag: 01. Oktober 1999

Anmelder/Inhaber: GLATT PROCESS TECHNOLOGY GMBH,
Binzen/DE

Bezeichnung: Bioabbaubare Trägersysteme für therapeutisch
wirksame Substanzen und Verfahren zu deren
Herstellung

IPC: A 61 K 47/30

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Oktober 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Wehner

GLATT PROCESS TECHNOLOGY GMBH

Bioabbaubare Trägersysteme für therapeutisch wirksame
Substanzen und Verfahren zu deren Herstellung

5

10

15

20

Die Erfindung betrifft eine geeignete Formulierung eines bioabbaubaren Trägersystems für therapeutisch wirksame, pharmazeutische Substanzen, die einerseits die Wundheilung fördern oder die gezielt zusätzliche pharmakologische Wirkungen im Organismus bewirken können. Die Freigabe des Wirkstoffs soll bei den beschriebenen Arzneiformen verzögert und allmählich erfolgen, wodurch für diese Arzneiformen eine verlängerte Wirkung im Sinne eines Depots erzielt wird. Bei den Trägersystemen handelt es sich um bioabbaubare Polymere, die im Human- oder Veterinär-Organismus toxikologisch unbedenklich, verträglich und immunogen sind. Als besonders geeignet werden die Fibrinkleber-Komponenten Fibrinogen und Thrombin, aber auch weitere bioabbaubare Polymere, wie z.B. Albumin oder auch Polymere aus Milchsäure und Glykolsäure, vorgeschlagen. Die Herstellung erfolgt

durch ein Granulations- bzw. Sprühagglomerationsverfahren in einer Wirbelschicht, wodurch spezifische Produkteigenschaften eingestellt werden können.

5 Fibrinkleber oder Gewebekleber werden in der Human-Medizin und in bestimmten Fällen (z.B. Rennpferde) auch in der Veterinär-Medizin in der Regel z.B. bei chirurgischen Eingriffen zur Förderung der Blutgerinnung bzw. Blutstillung und zum Verschließen von Wunden eingesetzt. Das Prinzip der Fibrinklebung entspricht der letzten Stufe des natürlichen Blutstillungssystems (Hämostase) bei Säugern, einer Co-Enzym/Enzym gesteuerten Kaskadenreaktion, bei der Fibrinogen durch Thrombin in Anwesenheit von Faktor XIII und Ca^{2+} -Ionen zu Fibrin umgesetzt wird. Während der Wundheilung wird das Fibrin wieder proteolytisch abgebaut und dadurch auf natürlichem Weg absorbiert. Technisch gleicht das Funktionsprinzip der Fibrinkleber dem Prinzip von Zwei- bzw. Mehrkomponentenklebern, die in der Regel entweder erst an der zu klebenden Stelle oder auch nur kurz vor dem eigentlichen Zeitpunkt miteinander gemischt bzw. in Kontakt gebracht werden.

Bei der Darreichung und Anwendung eines Fibrin-Gewebeklebers ist darauf zu achten, daß Fibrinogen und Thrombin erst direkt am Ort der Blutung zusammengebraucht werden, da die Gerinnung spontan einsetzt. Benachbarte Stellen sind aufgrund der sehr guten Haftwirkung dabei gut abzudecken. Voraussetzung für die Gerinnung ist die freie Beweglichkeit der einzelnen beteiligten Moleküle z.B. in Wasser. Praktisch wird dies in der Regel so gelöst, daß die beiden entscheidenden Komponenten Fibrinogen und Thrombin bis zur Applikation an der Wunde getrennt separiert werden und erst direkt an der Wunde in Kontakt

miteinander gebracht werden.

Die Komponenten müssen jeweils steril verpackt werden und in einer geeigneten Form und unter definierten Bedingungen so aufbewahrt werden, daß die Aktivität der einzelnen Proteine bzw. Enzyme durch die Lagerung nicht geschädigt wird. In der Regel wird dies so gelöst, daß die Proteinkonzentrate in gefriergetrockneter Form in Vials vorliegen. In dieser Form sind sie bei Kühlschrankbedingungen (4 bis 8 °C) für eine bestimmte Zeit und für eine kürzere Zeit auch bei Raumbedingungen (20 °C) lagerstabil. Gefriergetrocknet liegt das Konzentrat jedoch in fester, komprimierter und dadurch unbeweglicher Form, jedoch als löslicher Feststoff vor. Deshalb müssen die Proteinkonzentrate vor der Anwendung wieder vollständig in Lösung gebracht werden, um die gewünschte biochemische Reaktion starten zu können. Alternativ dazu können die Komponenten auch in tiefgefrorener, fester Form lagerstabil gehalten werden, die dann vor der Anwendung aufgetaut werden müssen und getrennt als Lösung zur Applikation kommen.

Die beiden Lösungen können dann jeweils über Injektionsspritzen z.B. im gleichen Volumenverhältnis zugegeben werden. Dabei ist die Fibrinogen-Lösung zuerst auf die Wunde aufzubringen und möglichst sofort mit der Thrombin-Lösung zu überschichten. Die zu klebenden Teile sind dann so lange zu fixieren, bis eine vorläufige Verfestigung eingetreten ist.

Weiterhin wird in der Patentanmeldung WO 97/44015 die Herstellung von Mikropartikeln auf Fibrinogen- und Thrombinbasis beschrieben, die jeweils einzeln sprühetrocknet werden. Der damit verbundenen Wasserentzug setzt die Beweglichkeit der Proteinmoleküle soweit herab, daß die Gerinnung nicht spontan einsetzen

kann. Die Mikropartikel sind alle kleiner 20 μm , bevorzugt kleiner 10 μm bzw. 2-5 μm , und sollen gut löslich sein. Miteinander vermischt können diese Fibrinogen- und Thrombin-haltigen Mikropartikel zur Blutstillung eingesetzt werden. Ein Nachteil ist jedoch, daß es sich dabei um ein stark staubendes Pulver handelt, wodurch eine direkte Applikation praktisch nicht möglich ist.

Kennzeichen der Fibrinkleber humanen, tierischen oder auch rekombinanten Ursprungs sind die sofortige und vergleichsweise starke Adhäsion des gebildeten Fibrins an dem Ort der Aufbringung (z.B. Wunde, Gewebe), die sich im vernetzten Fibrin ausbildende Matrixstruktur und die selbständige, biologische Abbaubarkeit des Fibrins. Weiterhin zeichnen sich die natürlichen Komponenten dadurch aus, daß diese Komponenten bereits im menschlichen oder auch tierischen Organismus vorhanden sind und deshalb toxikologisch unbedenklich und gut verträglich sind.

Aufgrund dieser Kennzeichen (Adhäsion, Matrix-Struktur, Verträglichkeit und Abbaubarkeit) können Fibrinkleber bzw. Komponenten eines Fibrinklebers ein geeignetes Trägersystem für zusätzliche therapeutisch wirksame Substanzen sein. Da ein Fibrinkleber jedoch wie beschrieben nur als Lösung bzw. in 2 getrennten Lösungen appliziert werden kann, ist es problematisch, für wirkstoffhaltige Fibrinkleber-Formulierungen homogene freisetzungskontrollierende Matrix-Strukturen aufzubauen.

Aus einer Reihe von Veröffentlichungen (siehe hierzu Veröffentlichungsliste) sind Fibrinkleber als Träger für Wirkstoffe bereits bekannt. Neben dem Einsatz von Antibiotika zur Unterdrückung von lokalen Infektionen wurden auch Zytostatika Fibrinklebern zugegeben, um

z.B. verbleibende Krebszellen nach der operativen Entfernung des Primärtumors lokal chemo-therapeutisch zu behandeln. Auch wurde z.B. Zink in Fibrinkleber mit eingearbeitet, um so einen höheren Gehalt an Zink über einen längeren Zeitraum direkt in der Wunde zu erzielen und so eine verbesserte Wundheilung zu ermöglichen (US 6,651,982). Weiterhin wird auch in EP 804153A1 die Kombination eines Fibrinklebers mit einem therapeutischen Wirkstoff beschrieben, der z.B. nach der operativen Entfernung eines Tumors als radiotherapeutischer Wirkstoff eingesetzt werden kann.

Somit ist bekannt, daß Fibrinkleber als Trägersystem für therapeutische Wirkstoffe eingesetzt werden können. Durch geeignete Maßnahmen kann die Wirkstoff-freisetzung so kontrolliert werden, daß die Frei-setzung verzögert über einen bestimmten Zeitraum erfolgt. Die Freisetzung dieser Wirkstoffe aus dem Trägersystem Fibrinkleber variiert gemäß den Angaben in der wissenschaftlichen Literatur von 24 Stunden bis einigen Tagen; bei schwer löslichen Wirkstoffen kann die Freisetzung sogar bis zu 40 Tagen dauern. Demnach ist es möglich, mittels der Kombination eines Fibrinklebers mit therapeutisch wirksamen Substanzen auch eine verzögerte bzw. verlängerte Wirkstofffrei-setzung mit einer langsamen, konstanten Wirkstoff-aufnahme in den Blutkreislauf und dadurch eine konstante Blutspiegelkonzentration des Wirkstoffs zu erzielen.

Generell sind derartige Darreichungsformen unter dem Begriff Depotarzneiformen bekannt und Ziel zahlreicher Entwicklungen. Depotarzneiformen werden auch parenteral angewandt. Vorteilhaft ergibt sich dabei z.B., daß statt einer i.v. Dauerinfusion Patienten Depotarzneiformen mit verzögerter Freisetzung verab-

reicht werden können, was für den Patienten eine erheblich höhere Selbständigkeit und Beweglichkeit bedeutet. Dies kann auch ermöglichen, durch eine gezielte lokale Applikation und eine sich daraus ergebende lokale Wirkstofffreisetzung, z.B. hoch aktiver Substanzen, wie z.B. Zytostatika oder auch bestimmter Antibiotika, diese Stoffe gezielter und dadurch geringer dosiert einsetzen zu können, als wenn diese über den üblichen Weg der oralen Darreichung eine systemische, den gesamten Organismus betreffende Wirkung entwickeln. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in der wissenschaftlichen Literatur gezeigt wird, daß Fibrinkleber sowohl für hydrophile als auch für lipophile Wirkstoffe ein gutes Potential als Trägersystem mit verzögertem Freisetzungsprofil besitzen.

Als parenterale Depotarzneiformen sind bekannt

- wässrige Suspensionen für schwerlösliche Wirkstoffe durch subkutane oder intramuskuläre Injektionen. Beispiel: Insulinpräparate (Wirkungsdauer 12-36 h). Kennzeichen ist das sehr aufwendige, aseptische Herstellungsverfahren für parenterale Suspensionen.
- ölige Lösungen, Suspensionen: Wirkstoff in Öl gelöst bzw. suspendiert, wodurch die Absorption des Wirkstoffs in der wässrigen Phase des Gewebes (und dadurch die therapeutische Wirkstofffreisetzung) bestimmt bzw. verlangsamt wird. Präparate zeigen sich teilweise durch eine sehr lange Wirkdauer aus (Wochen bis Monate).
- Emulsionen: Nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion verteilen sich die Emulsionen im Gewebe

und werden dort absorbiert. Derartige Systeme sind derzeit noch durch ein hohes Maß an Unverträglichkeiten charakterisiert.

- 5 - Hochviskose Lösungen, Suspensionen, Hydrokolloide (Polyvidon, Cellulosederivate) insbesondere für Protein- und Peptidwirkstoffe (gleichzeitig Schutzkolloidwirkung und Suspensionsstabilisatoren).
- 15 - Einsatz partikulärer Vehikel - Mikropartikel, Liposomen, Implantate. Mikropartikel und Liposomen erscheinen makroskopisch als Suspension bzw. Dispersion. Implantate sind hingegen Festkörper und werden als solche angewandt. Erste Präparate dieser Art sind bereits in verschiedenen Ländern eingeführt. Neben den nichtabbaubaren Silicium-implantaten, die nach Freigabe des eingebetten Wirkstoffs durch einen kleinen chirurgischen Eingriff wieder entfernt werden müssen, haben partikuläre Vehikel den Vorteil, daß sie bioabbaubar sind und damit nach ihrer hydrolytischen Spaltung vom Organismus selbst vollständig aus dem Gewebe entfernt werden. Zu beachten ist, daß die entstehenden Abbauprodukte weder toxisch noch immungen oder karzinogen sein dürfen. Die am meisten verwendeten Polymere sind daher aus gewebeverträglichen Milchsäure- bzw. Glykolsäuremonomeren (PLGA) hergestellt. Es sind jedoch auch Mikropartikel aus Albumin in der Radiodiagnostik bekannt, die sich insbesondere aufgrund deren
- 20 guter Verträglichkeit und Bioabbaubarkeit gut eignen. Ähnliches kann auch für partikuläre Vehikel aus Fibrinkleber-Komponenten gelten.
- 25
- 30

Den technischen Lösungen zur Darstellung parenteraler Depotarzneiformen mittels gelöster, suspendierter

oder emulgierter Wirkstoffe in Wasser, Lösungsmittel oder Öl ist gemeinsam, daß es sich dabei stets um sehr aufwendige Herstellungsverfahren und vor allem auch um teilweise komplizierte Applikationen handelt, deren pharmakologische Wirkung sich erst nach einer Reihe von (bio-)chemisch-physikalischen Absorptions-, Transport- bzw. Lösungsvorgängen im Organismus entfalten kann. Als Folge davon läßt sich die tatsächliche Bioverfügbarkeit nur eingeschränkt kontrollieren und verfolgen.

Eine vorteilhafte Entwicklung wäre es daher, für derartige (bisher flüssig zu verabreichende) Trägersysteme eine Darreichungsform zu finden, die durch eine definierte Matrix-Struktur, die während der Verabreichung für die Dauer der angestrebten Wirkstofffreisetzung konstant bleibt bzw. allmählich abgebaut wird, charakterisiert wird. Dies sind Eigenschaften, die z.B. bei bestimmten festen pharmazeutischen Darreichungsformen (wie Tabletten) bereits realisiert sind, die ein bestimmtes, retardiertes Freisetzungsverhalten z.B. im Magen-Darm-Trakt besitzen. Dies läßt sich nicht mit flüssigen Verabreichungen, wie diese für Fibrinkleber-Komponenten derzeit üblich sind, realisieren. Derartige, neue Darreichungsformen sollen verbesserte Depotarzneiformen sein.

Vorteilhaft erscheint dagegen der Einsatz partikulärer Vehikel, die u.U. direkt am Wirkort eingesetzt werden können, sofern diese dort geeignet fixiert werden können. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt dann z.B. über diffusionsgesteuerte Absorption im Gewebe oder am Wirkort. Die Applikation könnte dabei vorteilhaft z.B. als trockenes Pulver direkt erfolgen, ohne daß die Mikropartikel in einer Trägerflüssigkeit suspendiert werden. Die direkte trockene Applikation

durch Injektion der trockenen Partikel kann z.B. mit Hilfe der PowderJect® Technologie ("needle free Injection") erfolgen. Geeignete Partikelgrößen für dieses Verfahren liegen zwischen 50 und 200 µm. Auch ist es möglich, kleinere Partikel als Suspension zu injizieren oder größere Förmlinge mit einer dafür geeigneten, größeren Kanüle zu implantieren.

Hergestellt werden die Mikropartikel entweder durch Phasentrennverfahren oder durch Sprühtrocknung einer Polymer-Wirkstoff-Lösung bzw. -suspension. Es sind ebenfalls sterile oder zumindest aseptische Herstellungsbedingungen gefordert, die sehr anspruchsvoll sind. Umgangen werden diese Anforderung meist dadurch, daß die Mikropartikel nach der Sprühtrocknung sterilisiert werden. Dieses Vorgehen läßt sich jedoch nur für z.B. synthetische Polymere, die durch den Sterilisationsprozeß nicht unerwünscht verändert werden, anwenden. Thermisch labile, biologische Polymere mit spezifischer Aktivität auf Proteinbasis, wie z.B. Fibrinkleber bzw. Fibrinogen, können durch eine derartige Behandlung u.U. denaturiert werden, wodurch diese Verfahren für diese Art von Polymere nicht in Frage kommt. Weiterhin sind sprühgetrocknete Partikel vor allem auch dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgrößen sehr klein sind (in der Regel < 20 µm) und dadurch leicht zum Stauben neigen und praktisch nicht rieselfähig sind, wodurch eine exakte Dosierung bzw. direkte Applikation des pulverförmigen Feststoffs stark eingeschränkt wird.

In der wissenschaftlichen Literatur wird von Senderoff et al. bereits die Anwendung von Fibrinklebern als Trägersystem für therapeutisch wirksame Komponenten auf der Basis von Mikropartikeln

beschrieben, wobei dort die Systeme Fibrinkleber als Mikropartikel, Fibrinkleberpartikel mit Zuckercoating und Fibrinkleberstreifen mit dispergierten Wirkstoffpartikeln vorgeschlagen werden. Nach vorhergehender Emulgierung des Wirkstoffs, Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel und anschließender Verdampfung des Lösungsmittels können Mikropartikel gewonnen werden. Insbesondere dann, wenn diese Herstellungsschritte unter aseptischen Bedingungen im industriellen Maßstab durchgeführt werden müssen, handelt es sich dadurch um ein sehr aufwendiges Verfahren, welches aus industrieller Sicht als sehr problematisch zu bewerten ist.

Somit stellt sich die Aufgabe, feste Partikel in geeigneter Weise herzustellen, daß diese als Trägersysteme für therapeutisch wirksame Substanzen eingesetzt werden können, und auch gleichzeitig als Feststoff verabreicht werden können. Bei den das Trägersystem bildenden Komponenten handelt es sich im wesentlichen um bioabbaubare Polymere, die z.B. mindestens aus einer Fibrinkleber-Komponente bestehen können. Es können dafür aber auch andere Human- oder Tier-Proteine in Frage kommen, wie z.B. Albumin, welches sich dadurch auszeichnet, daß Albumin im Organismus bereits eine wichtige, biochemische Transportfunktion besitzt und deshalb sowohl gut verträglich als auch abbaubar sind, oder auch bekannte, verträgliche und bioabbaubare Polymere, wie z.B. Polymere aus Milchsäure/Glykolsäure (PLGA), Polyanhydride, Polyorthoester oder Polyethylencarbonat.

Erfinderisch wird dies dadurch gelöst, daß Partikel durch ein Granulationsverfahren in einer Wirbelschicht hergestellt werden, die z.B. die Komponenten

Fibrinogen und Thrombin enthalten. Vorgegangen wird dabei analog zu dem in der Deutschen Anmeldung 198 49 589.7 beschriebenen Verfahren bei dem entweder Mischgranulate enthaltend mindestens Fibrinogen und Thrombin oder auch Granulat-Mischungen, die eine Mischung von Fibrinogen- und Thrombin-haltigen Granulaten darstellt mittels eines Wirbelschichtverfahrens hergestellt werden. Neben den Fibrinkleber-Komponenten werden weiterhin mindestens eine oder auch mehrere zusätzliche therapeutische, pharmakologische Wirkstoffkomponente(n) so auf die Partikel bzw. die Granulate aufgetragen, daß diese dort ausreichend fixiert werden, um eine Applikation zusammen mit den Fibrinkleber-Komponenten zu ermöglichen. Dies kann bei Wirbelschichtanwendungen üblicherweise so erfolgen, daß der zusätzliche Wirkstoff zusammen mit mindestens einer der Fibrinkleber-Komponenten, bevorzugt mit Fibrinogen oder auch mit Thrombin gleichzeitig aus einer Polymer-Wirkstoff-Lösung oder -Suspension versprüht wird oder auch daß der Wirkstoff anschließend auf das sowohl Fibrinogen- als auch Thrombin-haltige Granulat aus einer Polymer-Wirkstoff-Lösung oder -Suspension aufgesprüht wird. Bei der ersten Variante kann der Wirkstoff z.B. direkt in das Granulatinere in die feste Fibrinkleber-Matrix eingebunden werden, wobei bei der zweiten Variante der Wirkstoff bzw. die Wirkstoffe auf der Partikel- bzw. Granulatoberfläche gebunden wird. Weiterhin sind die für Wirbelschichtverfahren bekannten zusätzlichen Prozeßoptionen wie Aufbringen eines (Schutz-)Coatings bestehend aus einem Lack oder auch aus einem Kolloid (Polyvidon oder Cellulosederivate) möglich. Diese Coatings können z.B. innerhalb des Granulates als Trennschichten oder nur als reines äußeres Coating auf der Oberfläche angebracht werden. Zweck dieser Coatings kann sein, daß dadurch ein Schutz z.B. des

Wirkstoffs erzielt wird. (z.B. Coating mit Antioxi-
dantien bei oxidationsempfindlichen Wirkstoffen) oder
auch um die verzögerte Wirkstofffreisetzung noch zu
verändern (verlängern). Zu beachten ist dabei jedoch,
daß mögliche äußere Coatings vermutlich auch die
adhäsive Wirkung des Fibrinklebers reduzieren oder
unter Umständen auch verstärken können. Auch denkbar
ist ein Coating aus Molekülen mit einer bestimmten
Affinität zu bestimmten Geweben. Neben den Fibrinkle-
ber-Komponenten als Trägerpolymer, können in analoger
Verfahrensweise auch Granulate bzw. Pulver aus Albu-
min oder aus den erwähnten bioabbaubaren Polymeren
hergestellt werden.

Auch hier gilt, daß für Produkte, die als Parentera-
lia eingesetzt werden, sehr strenge Herstellungsvor-
schriften zu beachten sind, insbesondere hinsichtlich
der konsequenten Ausrichtung aller Verfahrens- bzw.
prozeßtechnischen Maßnahmen auf höchste mikrobiolo-
gische Reinheit. Sowohl die keimfreie (aseptische)
Abfüllung insbesondere bei temperaturempfindlichen
Zubereitungen, die nicht im Endbehälter sterilisiert
werden können, als auch das Gebot niedriger Ausgangs-
keimzahlen zwingen hier zur Anwendung optimaler Sau-
berkeit und entsprechend entwickelter (aseptischer)
Produktionslinien.

Vorgeschlagen wird, gemäß Fig. 1 die prinzipiellen
Herstellungsschritte zur Isonlierung bzw. Gewinnung
der Polymere (z.B. die Blutplasmafraktionen
Fibrinogen und Thrombin) und der Wirkstoffe, sowie die
Herstellung des Pulvers bzw. der Granulate bzw. der
Mikropellets und die Abfüllung der Granulate in die
Endverpackung strikt zu trennen. Dabei können je
nach den Anforderungen die jeweils von den nationalen
und internationalen Richtlinien (z.B. GMP-Richtli-

nien) geforderten Raumklassen (Reinraum Zone A bzw. Raumzone C/D) entsprechend eingehalten werden.

Für den Bereich der Granulat- bzw. Pulver- oder Pelletherstellung (Fig. 2) gilt -wie in der pharmazeutischen Produktion üblich -, daß der Produktions- und der Technikbereich räumlich klar, z.B. durch bauliche Maßnahmen 38, voneinander getrennt werden. Im Technikbereich befinden sich die notwendigen technischen Zusatzeinrichtungen, die für das Betreiben der Anlage erforderlich sind. Dies kann im Bereich der Ansaugung von Frischluft 1, die Prozeßluftaufbereitung, inkl verschiedener Filterstufen, Heizung und Kühlung, 2, einen zusätzlichen Sterilfilter 3, ein sterilisierbares Doppelklappensystem 4 und im Bereich der Abluft wiederum ein sterilisierbares Doppelklappensystem 17, einen Sterilfilter 16 und den Ventilator 15 umfassen. Ebenso im Technikbereich angeordnet sind eine Umlauf-Reinigungsstation 5 zur CIP (Cleaning-In-Place)-Reinigung der Anlage und verschiedener Anlagenkomponenten sowie ein Reinstampferzeuger 6 zur Bereitstellung von Sterildampf zur Sterilisierung der Anlage, der Reinigungsanlage und weiterer im Detail noch zu spezifizierender Komponenten. Über die Reinigungsstation 5 kann die Anlage gemäß einem festzulegenden Reinigungsprogramm (Paarameter sind Art des bzw. der Reinigungsmittel, Reinigungszeiten, Temperaturen und Menge der Reinigungsmittel bzw. des zum Spülen bzw. Nachspülen verwendeten Wassers) gereinigt werden. Über ein Rohrleitungssystem werden an der Anlage und im Rohrleitungssystem verschiedene Reinigungsdüsen angefahren. Gleiches gilt für den Vorgang der Sterilisierung, bei dem sowohl die Anlage als auch verschiedene Positionen im Rohrleitungssystem mit Sattdampf beaufschlagt werden. Die Sterilisierung

erfolgt gemäß einer einzustellenden Rezeptur nach entsprechenden Autoklavier-Bedingungen: nach dem Aufheizen der Anlage bis auf die gewünschte Sterilisationstemperatur (z.B. 121 °C und 3 bar Satt-

5 dampfdruck), wird eine bestimmte Haltezeit die gesamte Anlage und die zu sterilisierende Peripherie, z.B. 20 Minuten, eingehalten. Nach dem Abkühlen der Anlage auf z.B. Raumtemperatur oder einer höheren

10 Prozeßtemperatur steht die dann sterilisierte Anlage für einen neuen Prozeß zur Verfügung, wobei darauf geachtet werden muß, daß die Anlage nicht geöffnet werden darf. Der Anlagenturm 9 besitzt neben speziellen CIP-fähigen Metallfiltern 20 weitere spezifische, CIP-fähige Kjonstruktionsdetails, wie z.B.

15 spezielle, nicht dargestellte Aseptik-O-Ringe, und geeignete, kontaminationsfreie Andocksyste 18, 19 für etwaige Vorlagebehälter 13 und Produktauffangbehälter 11, die ihrerseits allein z.B. dampfsterilisierbar sind. Die Behälterwand der Anlage ist als

20 Doppelmantel 7, zum Beheizen und Kühlen, sowie u.U. mit einer zusätzlichen Isolierung 8 ausgeführt. Die Wirkstoff- bzw. Polymer-haltige Lösung oder Suspension wird über eine Pumpe 12, z.B. eine Schlauchpumpe, aus einem geschlossenen Vorlagebehälter 10, der aus der Wirkstoff- bzw. Polyymmerherstellung kommt, in die Anlage eingesprüht. Denkbar ist auch, daß der Vorlagebehälter 10 im Bereich der Poymer- bzw. Wirstoffherstellung stehen bleibt und über ein geeignetes

30 Schlauch- bzw. Rohrleitungssystem mit der Sprühpumpe 12 verbunden wird. Die Bedienung der Anlage und der Peripherieeinrichtungen erfolgt ein Bedienterminal 14, welches sowohl im Produktionsbereich als auch außerhalb des Produktionsbereiches installiert werden kann. Alternativ zu der beschriebenen offenen Herstellungsweise, bei der Frischluft über mehrere

35 Filterstufen durch die Anlage gezogen wird und nach

entsprechender Behandlung der Abluft wieder der Umgebung zugeführt wird, ist eine geschlossene Betriebsweise, bei der die Zuluft- und die Abluftseite mittels eines Kreislaufs verbunden sind, möglich.

Die Abfüllung der Granulate, des Pulvers bzw. der Pellets erfolgt wiederum in einem eigenen Bereich. Dieser Bereich kann z.B. in Isolatortechnik (Fig. 3) derart ausgeführt sein, daß der Produktauffangbehälter 11 geschlossen nach erfolgter Granulatherstellung an eine geeignete Isolator-Abfülleinheit 21 angedockt wird. Nach Öffnen der kontaminationsfreien Klappe 39 wird das Produkt in einem speziellen Bereich gesiebt 22 und u.U. gemischt 23. Bevor es in der eigentlichen Abfülleinheit 24 dann in die Einzelbinde 32 dosiert wird, werden Muster gezogen und im Rahmen der vorgeschriebenen In-Prozeß-Kontrolle analysiert 28. Nachdem die Einzelbinde 32 befüllt sind, werden die Behälter verschlossen 26 und verlassen so die Abfülleinheit und werden dann den nachfolgenden Produktionseinheiten, wie In-Prozeß-Kontrollen im Rahmen der Qualitätssicherung und -kontrolle und letztendlich der Verpackung bzw. Konfektionierung 27 zugeführt. In ähnlicher Weise werden der Abfülleinheit 24 die leeren Primärpackmittel 29, nachdem diese eine Wasch- und Spüleinrichtung 30 durchlaufen und in einem Sterilisationstunnel 31 sterilisiert werden, zugeführt. Innerhalb der Isolator-Abfülleinheit herrschen in den jeweiligen Behandlungsschritten mit offenem Produktehandling 33, 34, 35, 36 und 37 Reinraumbedingungen (d.h. Überdruck gegenüber der Umgebung, Partikelklasse 100 und Strömungsverhältnisse gemäß Laminar-Flow). Weiterhin besteht zwischen diesen Zonen 33, 34, 35, 36 und 37 ein definiertes Druckgefälle, so daß es zu keiner

Kreuz-Kontamination kommen kann. Bei entsprechender baulichen Konzeption ist es auch möglich, auf die Übertragung des Produktes mittels des Auffangbehälters 11 zu verzichten. Dies sieht dann so aus, daß in einer mehrgeschößigen, vertikalen Anordnung die Abfülleinheit direkt unter dem Anlagenturm der Granulatherstellung angebracht wird. Auch muß jedoch dann die Granulatherstellung von der Abfülleinheit durch bauliche Maßnahmen getrennt werden.

Mögliche Formulierungen können sein:

- Mischungen von Partikeln bzw. Granulaten, die Fibrinkleberkomponenten und Wirkstoffen, die sowohl hydrophile, amphiphile oder auch lipophile Eigenschaften haben können. Die Wirkstofffreisetzung kann dabei auch durch aus dem Stand der Technik bekannte Formulierungszusatzstoffe beeinflusst werden. Weiterhin können Hilfsstoffe wie z.B. Lecithine (Ei- oder Sojalecithin) zur Verbesserung der Benetzbarkeit den Partikeln bzw. den Granulaten zugemischt werden. Das Größenspektrum derartiger Pulver- bzw. Granulatmischungen kann in einem Bereich von 50 bis 500 μm oder bevorzugt in einem Bereich von 50 bis 200 μm oder auch von 200 bis 500 μm liegen.
- Mischungen von Partikeln bzw. Granulaten, die eingebunden z.B. Polymer-Mikropartikel mit zusätzlichen Wirkstoffen enthalten. Bei den Polymeren kann es sich auch um nicht Fibrinogen- bzw. Thrombinhaltige Polymere synthetischen Ursprungs, die jedoch ebenfalls biologisch abbaubar sind, handeln. Als Beispiel sind zu nennen Polymere aus Milchsäure/Glycolsäure (PLGA) oder Polyanhydride oder Polyorthoester oder andere gemäß dem Stand der Technik bekannte und geeignete Polymere. Es können jedoch auch Polymere auf Proteinbasis, wie

z.B. Albumin, sein. Auch geeignet sind synthetische Polymere, die als synthetischer Fibrinkleber eingesetzt werden, wie z.B. Poly-Octylcyanoacrylat. Das Größenspektrum derartiger Pulver- bzw. Granulatmischungen kann in einem Bereich von 50 bis 500 μm oder bevorzugt in einem Bereich von 50 bis 200 μm oder auch von 200 bis 500 μm liegen.

- Mischungen von Partikeln bzw. Granulaten, die sich jeweils aus einem inneren Kern und einer äußeren Schicht zusammensetzen. Bei der äußeren Schicht handelt es sich um Fibrinkleber-Komponenten, um eine ausreichende Fixierung der Partikel bzw. der Granulate im Gewebe zu gewährleisten. Der innere Kern kann dagegen auch inerten, üblichen Hilfsstoffen, wie z.B. Kohlenhydrate (Lactose, Mannitol, etc.) gebildet werden. Durch entsprechende Auswahl der Hilfsstoffe bzw. durch entsprechende galenische Formulierung kann dann die Löslichkeit des Kern so beeinflusst werden, daß dieser z.B. nur schwer löslich ist und dadurch auch eine verzögerte bzw. verlängerte Freisetzung von Wirkstoffen bewirkt. Sowohl in die äußere Schicht als auch in den inneren Kern kann der zusätzliche Wirkstoff bzw. können die Wirkstoffe eingebunden sein. In Frage kommen dafür z.B. quervernetzte Polymere, z.B. Cellulosederivate, die z.B. bei Matrix-Tabletten zum Einsatz kommen. Das Größenspektrum derartiger Pulver- bzw. Granulatmischungen kann in einem Bereich von 50 bis 500 μm oder bevorzugt in einem Bereich von 50 bis 200 μm oder auch von 200 bis 500 μm liegen.

- Festkörper, die durch Verpressen der Partikel- bzw. der Granulatmischung zu Tabletten oder auch durch Komprimieren zu Komprimaten (z.B. Walzenkompaktierung mit anschließender Siebung (= Kalibrie-

rung) zur Einstellung definierter Größen oder auch
 Brikettierung) hergestellt werden können. Dadurch
 ergeben sich weitere Freiheitsgrade für die gale-
 nische Formulierung, wodurch sich zusätzlich die
 Freisetzung verändern kann aber auch neue Applika-
 tionsformen möglich sein werden. Gemäß dem Stand
 der Technik sind z.B. folgende Modifikationen
 denkbar: Mantel-Kern-Tabletten, Matrixtabletten,
 Oros-Tabletten, Komponenten, die die Freisetzung
 steuern, Tablettengröße und -form. Mittels Kom-
 paktoren lassen sich dagegen z.B. längliche, dünne
 Streifen aus dem Pulver bzw. dem Granulat herstel-
 len, die wiederum direkt in eine Körperöffnung
 oder einen Schnitt nach chirurgischen Eingriffen
 flächig eingelegt werden könnte. Sowohl mittels
 Tabletten als auch mittels Extrudaten lassen sich
 definierte und gezielte Matrix-Strukturen der
 Fibrinkleber-Komponenten und der Wirkstoffkompo-
 nenten aufbauen. Auch denkbar sind z.B. zusätz-
 liche stabilisierende, netzartige Gewebestruk-
 turen, die entweder zusätzlich zusammen mit den
 Tabletten oder mit den Komprimaten appliziert
 werden können.

- kompakte, homogene Mikropellets mit einem mitt-
 leren Partikeldurchmesser von rund 50 µm. Dabei
 kann es sich um bioabbaubare, auch nicht Fibrino-
 gen- oder Thrombin-haltige Mikropellets (z.B.
 Albumin, PLGA) handeln, die auf der äußeren Ober-
 fläche mit einer Fibrinkleber-Komponente über-
 zogen werden. Dadurch werden die bekannt guten
 Adhäsionseigenschaften des Fibrinklebers ausge-
 nutzt. In dem inneren bioabbaubaren Polymer-Kern
 ist zusätzlich noch mindestens eine oder auch
 mehrere therapeutisch wirksame Substanz eingebaut.
 Vorteil ist, daß dadurch die Mikropellets besser

lokal verabreicht werden und auch fixiert werden können. Auch können die Schichten einen unterschiedlichen zeitlichen Ablauf der Bioabbaubarkeit haben.

5

- kompakte, homogene Mikropellets mit einem mittleren Partikeldurchmesser von rund 50 µm, die aus einem Kern von Fibrinkleber-Komponenten bestehen und in die schwer-lösliche Wirkstoffe eingelagert sind.

Applikationsmöglichkeiten des Fibrinklebers als Trägersystem sind:

15

- Topische Anwendung in gleicher Weise wie herkömmlicher Fibrinkleber zur Blutstillung bei Wunden, chirurgischen Eingriffen, offenen Körperhöhlen oder über mucosale Membranen, z.B. Mund, Nase, Kolon oder Vagina, für lokale oder systemische Applikation.

20

- Anwendung als parenterale Depotarzneiform in Verbindung mit den Eigenschaften der Verträglichkeit, Adhäsivität, Bioabbaubarkeit in der Form als Pulver bzw. als Granulatmischung oder auch Mikropellets, ohne daß diese vor der Applikation gelöst oder suspendiert werden (z.B. mittels spezieller, medizintechnischer Applikatoren, wie z.B. PowderJect® Injektion, d.h. needle-free Injektion von Feststoffen).

25

30

- Anwendung als parenterale Depotarzneiform in Verbindung mit den Eigenschaften der Verträglichkeit, Adhäsivität, Bioabbaubarkeit als Mikropellets-Suspension bzw. einer Trägerflüssigkeit als Dispersion. In Frage kommen dafür z.B. ölige Suspensionen (Tri-Glyceride, Sesamöl). Um ein

vorzeitiges Koagulieren der suspendierten Mikro-
pellets vor bzw. bei der Injektion zu verhindern,
können der Suspension Antikoagulationen (z.B. tri-
Natrium-Citrat) zugegeben werden. Bei den Poly-
meren auf der Basis der Fibrinkleber-Komponenten
muß besonders auf die üblichen Probleme der der-
zeit verfügbaren Systeme für Fibrinkleber geachtet
werden (= spontane Gerinnung durch vorzeitiger
Kontakt der aktiven Komponenten Fibrinogen und
Thrombin muß verhindert werden => aufwendige Vor-
bereitung, etc. siehe unsere Deutsche Patentan-
meldung 198 49 589.7).

- Anwendung als Trägersystem für therapeutische
Wirkstoffe über die nicht-parenterale Verabrei-
chung (z.B. orale, topische, rektale oder vaginale
Applikation).
- transdermale Applikation (Pflaster).

Bevorzugt kann das Verfahren zur Herstellung von
Pulver oder Granulaten so ausgeführt werden, daß das
Fluidisationsgas durch die Wirbelschichtkammer von
unten nach oben geführt wird und die zu trocknende
Flüssigkeit (Lösung oder Suspension) von oben (Top-
Spray), von unten (Bottom-Spray) oder auch seitlich
(Rotor-Wirbelschicht) über ein Sprühsystem einge-
sprüht wird. Das Fluidisationsgas hat gleichzeitig
die Aufgabe, in der Wirbelkammer vorliegendes Produkt
zu verwirbeln, die zum Verdunsten der Sprühflüssig-
keit (Wasser oder organisches Lösungsmittel) benö-
tigte Wärme dem Sprühstrahl oder dem feuchten Produkt
zuzuführen und gleichzeitig die verdunstete Flüssig-
keitsmenge aufzunehmen und abzutransportieren. Der
Austrag des getrockneten Produktes wird einerseits
durch die Wahl einer geeigneten Fluidisationsge-
schwindigkeit (kleiner als die rechnerisch und expe-

rimentell ermittelbare sog. Austraggeschwindigkeit für das Produkt), andererseits auch durch einen im oberen Bereich der Wirbelkammer vorhandenen und regelmäßig abreinigbaren Produktrückhaltefilter oder auch durch einen anderen aus dem Stand der Technik bekannten Produktabscheider (wie z.B. ein Zyklonabscheider) verhindert.

Die im Sprühkegel fein zerstäubten Flüssigkeitströpfchen treffen dabei auf das aufgewirbelte pulverige Trägermaterial und trocknen dort aufgrund der für Wirbelschichtverfahren idealen Wärme- und Stoffübergangsverhältnisse, die im wesentlichen eine Folge der sehr großen spezifischen Partikeloberflächen des verwirbelten Produktes sind. Während des Sprühens kommt es z.B. aufgrund der im Partikel langsam zunehmenden Produktfeuchte zur Ausbildung von Agglomeraten oder Granulaten und dadurch zu einer Zunahme der Partikelgröße.

Bei der Wahl der Prozeßbedingungen muß für thermisch labile Produkte (Polymere bzw. Wirkstoffe) primär darauf geachtet werden, daß diese durch hohe Temperaturen nicht geschädigt werden. Dies gilt insbesondere dann, wenn native Polymere auf Proteinbasis verarbeitet werden, besonders für die nativen Fibrinkleber-Komponenten (vorallem für Fibrinogen). Geeignete Zulufttemperaturen liegen z.B. zwischen 15 und 100 °C für die Produkttemperatur bevorzugt jedoch kleiner 37 °C (dies gilt besonders für Fibrinogen). Bei Albumin können dagegen auch Produkttemperaturen z.B. bis zu 50 °C möglich werden, ohne daß es zu einer Denaturierung des Albumins kommt. Berücksichtigt werden muß dabei, daß eine mögliche Inaktivierung immer im Zusammenhang mit einer bestimmten Feuchte betrachtet werden muß, d.h. die Temperaturstabilität nimmt mit abnehmender Produktfeuchte im Feststoff zu, so daß

gegen Ende der Trocknung auch höhere Temperaturen akzeptabel sein können.

5 Ein weiterer wichtiger Parameter zur Bewertung eines Prozesses ist die sog. Ausbeute oder auch Wiederfindungsrate der eingesprühten Substanz auf dem Trägermaterial. Ziel ist natürlich, nahezu 100 % der über
10 die Sprühflüssigkeit eingebrachten Substanz auf dem Träger oder in der Wirbelkammer wiederzufinden. Auch hier gilt, daß die Parameter (z.B. Fluidisationsgeschwindigkeit, Menge Produktvorlage, Position der Spühdüse, Apparategröße- und geometrien) gemäß dem bekannten Stand der Technik der Wirbelschichttechnik geeignet ausgewählt und über Versuche angepaßt werden müssen und können.

15 Die Trocknung muß bis zu einer Restfeuchte erfolgen, die so klein ist, daß je nach den gewählten Lagerbedingungen keine unerwünschten molekularen Änderungen der Polymere beobachtet werden oder daß es bereits zu
20 einem merklichen Wirkstoffververlust kommt. Für die Polymermatrix auf der Basis der Fibrinkleber-Komponenten muß die Restfeuchte so gering sein, daß die Gerinnungsreaktion nicht spontan abläuft. Geeignete Lagerbedingungen können sein: Kühl Lagerung bei 4 bis
25 8 °C oder Raumbedingungen (20 °C). Das Granulat kann zusätzlich in einer schützenden Atmosphäre (z.B. Stickstoff oder Kohlendioxid) und z.B. unter Lichtausschluß eingeschlossen sein. Mögliche Restfeuchten können dann z.B. zwischen 0,1 - 5 % Wassergehalt liegen.

30 Homogene, wirkstoffhaltige Mikropellets, deren Polymere mittels Fibrinkleber-Komponenten oder anderer bioabbaubarer Protein oder auch mittels bioabbaubarer Polymere, wie z.B. Milchsäure/Glykolsäure-Polymere, gebildet werden, können dagegen bevorzugt auch durch

5 direktes Einsprühen aus einer Polymer-Wirkstoff-
Lösung oder -Suspension in eine leere Anlage erzeugt
werden. Dabei werden in der Anlage in-situ Granulat-
keime bzw. fein verteilte Partikel erzeugt, die als
10 Starterkerne für eine weitere Granulation dienen
können. Die dafür zu verwendende Anlage kann z.B. ein
Sprühturm oder auch eine Wirbelschichtanlage mit
ausreichend freier Flugstrecke für die versprühten
Flüssigkeitströpfchen sein. Bei Einhaltung geeigneter
15 Prozeßbedingungen können die versprühten Flüssig-
keitströpfchen entsprechend den Verhältnissen eines
Sprühtrockners (jedoch mit reduzierten Trocknungstem-
peraturen) in einer Wirbelschichtanlage getrocknet
werden, bevor sie z.B. im noch feuchten Zustand die
20 Behälterwand berühren und dort kleben bleiben. Diese
so erzeugten feinen Partikel werden durch das Fluidi-
sationsgas in Bewegung und in der Schwebe gehalten
und kommen so mit dem Sprühnebel der weiterhin einge-
sprühten Flüssigkeit in Kontakt und beginnen dann zu
granulieren. Auf diese Weise kann, insbesondere durch
sehr vorsichtige Fahrweise des Prozesses während des
Anfahrens des Prozesses, in der ursprünglich leeren
Anlage ein definiertes Granulatwachstum generiert
werden. Dies kann z.B. durch Zugabe bekannter Binde-
mittel unterstützt werden. Durch Kombination mit
einem klassierenden Granulataustrag (z.B. über einen
Zick-Zack-Sichter und klassierendem Luftstrom)
besteht die Möglichkeit, Granulat mit einer definier-
ten Partikelgröße in der Anlage zu erzeugen und den
Prozeß sogar in einer kontinuierlichen oder quasi-
kontinuierlichen Fahrweise zu betreiben. Das hier
beschriebene Verfahren basiert im wesentlichen auf dem
Europäischen Patent EP 85103501.4.

Damit lassen sich die folgenden physikalischen Produkteigenschaften erzielen:

- Partikeldichte: 250 - 2000 g / ml, bevorzugt 500 - 1500 g / ml
- Partikelgrößen: 20 - 1000 µm, bevorzugt 50 - 500 µm oder 30 - 350 µm
- Partikelgrößenverteilung: z.B. Über- bzw. Unterkorn +/- 50 % von der mittleren Korngröße, bevorzugt +/- 25 % der mittleren Korngröße
- Wirkstoffgehalt: 0,1 - 100 %
- Produkteigenschaften: staubfrei, rund, schalenförmiger Partikelaufbau, vergleichsweise hohe Dichte, keine inerten Kerne, kein Abrieb.

Die verwendeten therapeutischen Wirkstoffe können den folgenden Wirkstoffklassen zugeordnet werden:

Human-Anwendungen:

- Antibiotika
- Cortico-Steroide
- Antimykotika
- Neuroleptika
- Antiepileptika
- Steroidhormone
- Krebshemmende Hormone
- Substanzen, die die Wundheilung fördern
- Zytostatika
- Immunmodulatoren
- Narkotika, Analgetika
- Peptidhormone (Supstitutionstheapie)
- Antirheumatika
- Impfstoffe, Antikörper
- Monoklonale Antikörper
- Aminosäuresequenzen (DNA, Peptide, Proteine) =>

Gentherapie

- Biologische Zellen (Gentherapie)
- Biotechnologisch hergestellte Wachstumsfaktoren, -
zellen (Tissue growth factors)

5

Tiermedizin:

- Hormone
- Antibiotika
- Insektizide, Anthelminika
- Impfstoffe, Antikörper

10

15

GLATT PROCESS TECHNOLOGY GMBH

"Bioabbaubare Trägersysteme für therapeutisch wirksame Substanzen und Verfahren zu deren Herstellung"

5 Patentansprüche

1. Trägersystem für Depotarzneimittelformulierung
enthaltend mittels Wirbelschichttrocknung unter
Erhalt ihrer Eigenschaften getrocknete bioabbaubare Polymere.
2. Trägersystem nach Anspruch 1, dadurch
gekennzeichnet, daß das bioabbaubare Polymer
ausgewählt ist aus der Gruppe Polymilchsäure,
Polyglykolsäure, Stammpolymere, Copoly(L-
Milchsäureoxiethylen-beta-L-Milchsäure)Poly-
anhydrid, Polyorthoester, Polyethylencarbonat
oder Fibrinkleber.
3. Trägersystem nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß das bioabbaubare Polymer in
Form eines mikroporösen Granulates mit einer
Korngröße von 20 bis 500 µm vorliegt.
4. Trägersystem nach Anspruch 3, dadurch
gekennzeichnet, daß es ein Festkörper ist, der
durch Verpressen der Granulate hergestellt
worden ist.
5. Depotarzneimittelformulierung, dadurch
gekennzeichnet, daß sie aus einem Trägersystem
nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 und
einem als Depot zu applizierenden Wirkstoff oder
einer Wirkstoffkombination besteht.
6. Depotarzneimittelformulierung nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, daß die Formulierung
eine Granulat-Mischung von Partikeln des

Trägersystems und des als Depot zu applizieren-
den Wirkstoff oder einer Wirkstoffkombination
enthält.

- 5
7. Depotarzneimittelformulierung nach Anspruch 5
oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Formu-
lierung ein Mischgranulat des bioabbaubaren
Polymers und des Wirkstoffes bzw. der Wirkstoff-
kombination enthält.
- 10
8. Depotarzneimittelformulierung, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Formulierung ein Trägersystem
nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, den
als Depot zu applizierenden Wirkstoff oder einer
Wirkstoffkombination und eine Trägerflüssigkeit
in der für parenterale Formulierung erforderli-
chen Reinheit enthält.
- 15
9. Verfahren zur Herstellung eines Trägersystems
nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch
gekennzeichnet, daß das bioabbaubare Polymer in
Form einer Lösung oder Suspension in eine
Wirbelschichtapparatur eingesprüht und unter
Erhalt der Eigenschaften schonend getrocknet
wird.
- 20

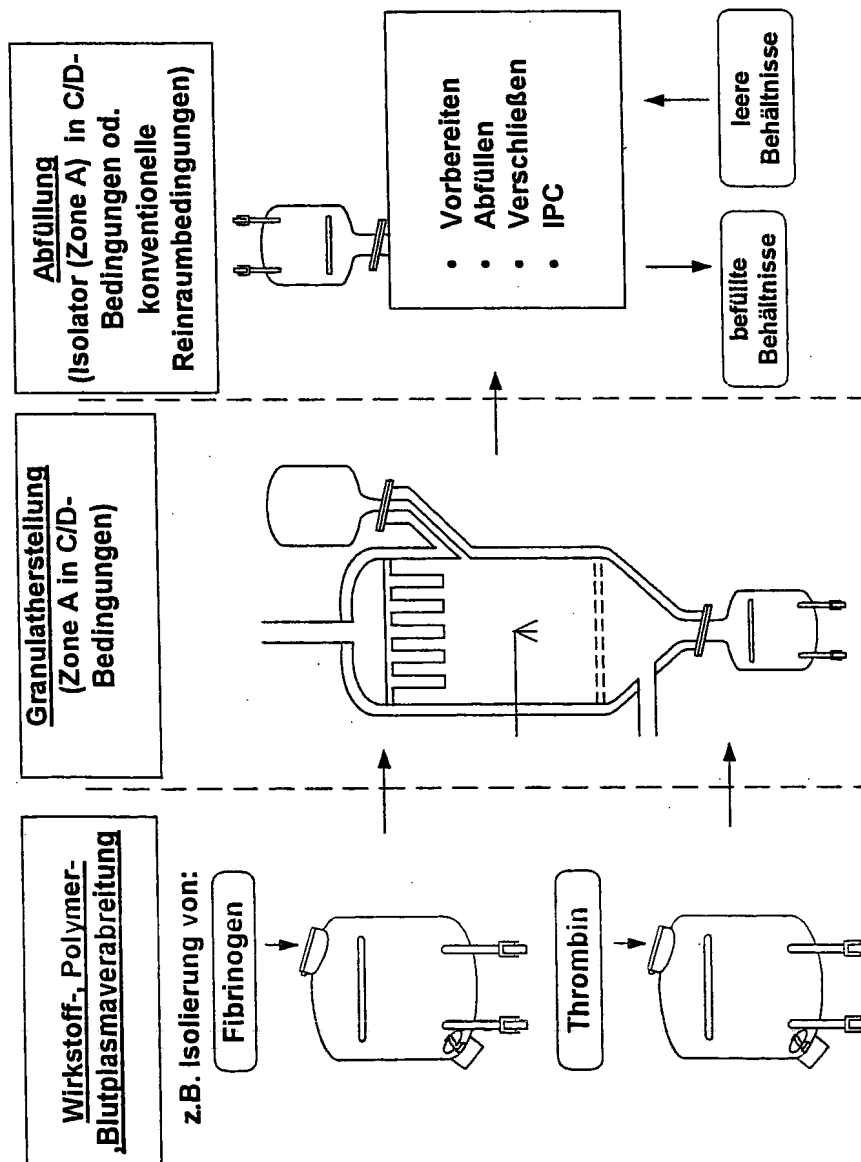


Fig. 1

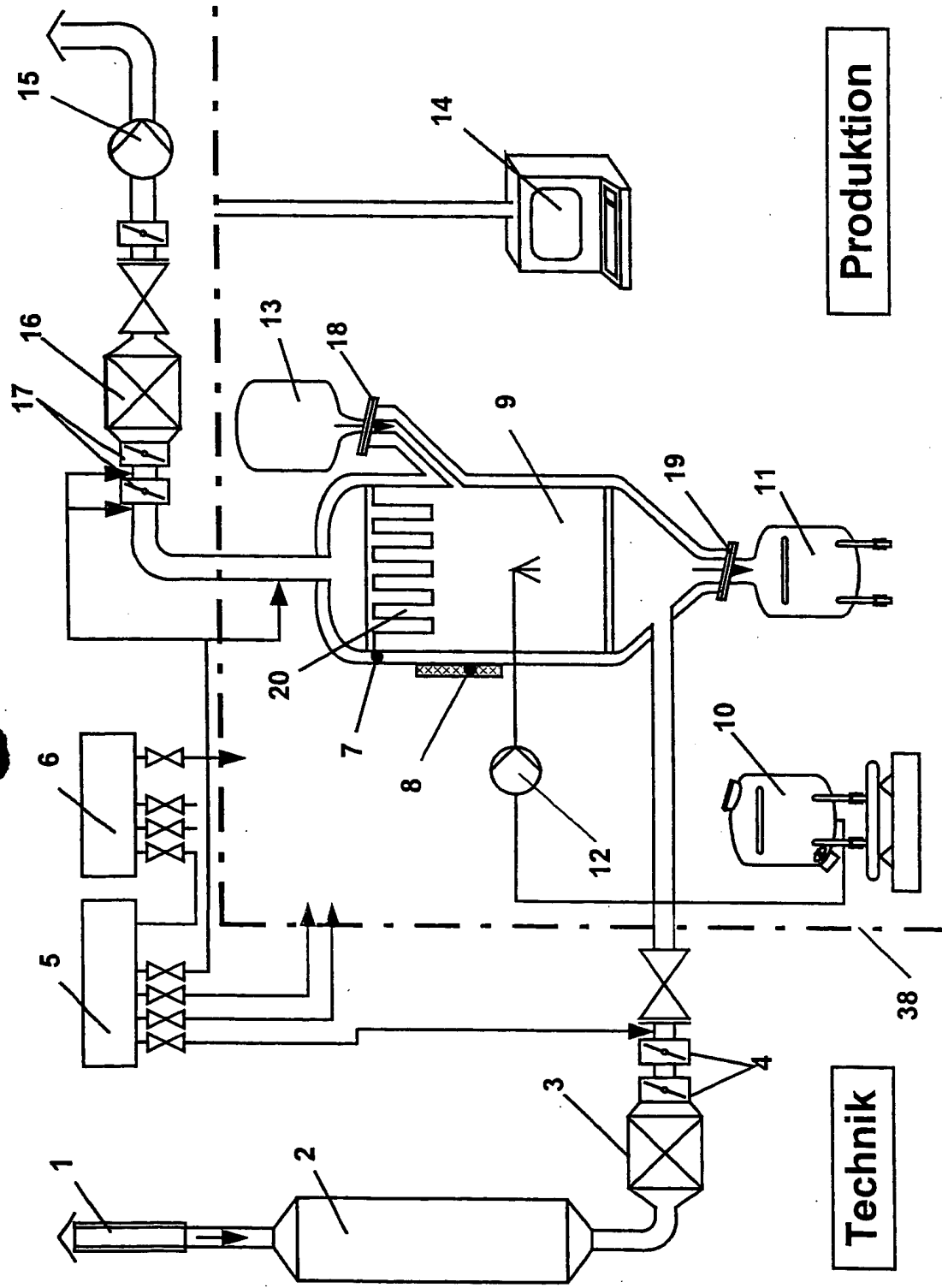


Fig. 2

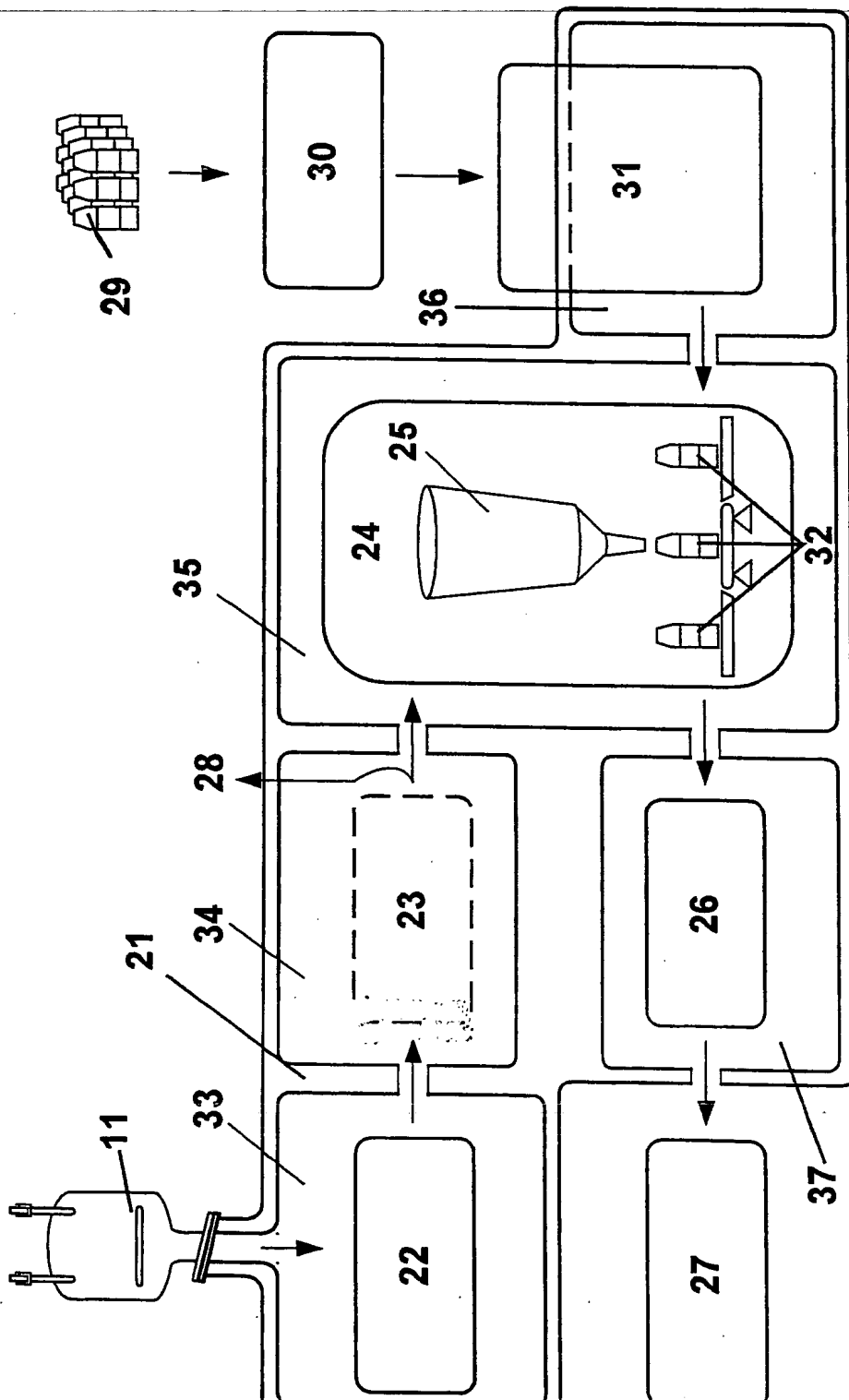


Fig. 3

